

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 02 JUL 2001

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire /.	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/00757	Date du dépôt international (jour/mois/année) 23/03/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 26/03/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K2/00		
Déposant MALINA, Halina		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 7 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 26/10/2000	Date d'achèvement du présent rapport 28.06.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Jenn, T N° de téléphone +49 89 2399 7348 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00757

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

3,4	reçue(s) avec télécopie du	09/04/2001
2,5,6	reçue(s) avec télécopie du	15/06/2001
1	reçue(s) avec télécopie du	21/06/2001

Revendications, N°:

1-6	reçue(s) avec télécopie du	21/06/2001
-----	----------------------------	------------

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00757

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-6
	Non : Revendications Aucune
Activité inventive	Oui : Revendications 1-6
	Non : Revendications Aucune
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-6
	Non : Revendications Aucune

2. Citations et explications
voir feuille séparée

Déclaration motivée selon l'Article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

D1: Kotake Y et al., JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 77, no. 3, mars 1975 (1975-03), pages 685-687, **cité** dans la demande en page 1, ligne 7;

D2: Kobayashi K et al., CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, vol. 28, no. 10, octobre 1980 (1980-10), pages 2960-2966, cité dans la demande en page 1, ligne 8.

- Formulaire PCT/Feuille séparée/409 (feuille 1) (OEB-avril 1997)

6. La **solution** de ce problème proposée dans la revendication 1 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité **inventive** (Article 33(3) PCT), et ce pour la raison suivante:

L'acide xanthurénique lié de façon covalente à une protéine est un composé qui ne peut être déduit des documents disponibles de l'art antérieur (qui décrivent uniquement un complexe (voir § 1 ci-dessus) ou une interaction électrostatique ou hydrophobe (voir § 2 ci-dessus))

7. Les revendications 2-6 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

8. Application industrielle (Article 33(4) PCT):

L'objet des revendications 1 à 6 a pour application l'induction d'une réponse immunitaire contre les pathologies induites par des modifications de physiologie cellulaire dues à l'acide xanthuronique (page 1, lignes 3-5 et page 6, lignes 10-16).

WO 00/58344

PCT/FR00/00757

Modification des protéines par l'acide xanthurénique

La présente invention a pour but l'induction d'une réponse immunitaire contre les pathologies induites par des modifications de physiologie cellulaire par l'acide xanthurénique. La présente invention concerne aussi une façon d'induction régulée de pathologie

- 5 cellulaire en présence de l'acide xanthurénique. Elle est relative à une formation de protéines modifiées de façon covalente par l'acide xanthurénique *in vitro* ou dans un système cellulaire, et non pas de façon non-covalente comme décrit précédemment (Kotake Y. et al. J. Biochem. 1975, 77, 685-687; Kobayashi K. et al. Chem. Pharm. Bull. 1980, 28, 2960-2966). La base de l'invention est une observation du fait que l'acide xanthurénique mène à la modifi-
- 10 -cation covalente de protéines dans des cellules et provoque une modification de la physiologie cellulaire. Précédemment, il a été reporté que l'acide xanthurénique s'accumule dans le cristallin de l'œil bovin (Malina et al. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1995, 233, 38-44), et humain (Malina et al. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1996, 234, 723-730) avec l'âge, dans sa présence les α , β , γ - cristallines forment des agrégats (idem) et deviennent fluorescentes
- 15 (Malina et al. Eur. J. Ophthalmol. 1996, 6, 250-256). Les conjugués covalents sont formés par la préparation des produits oxydés de l'acide xanthurénique, nommés DOXA et sa réaction avec des cristallines de l'œil (Malina et al. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1996, 234, 723-730). Récemment, les expériences ont montré que l'acide xanthurénique s'accumulant dans une cellule conduit à une modification de la physiologie cellulaire.
- 20 Cette modification est due à une accumulation de protéines mal repliées. L'acide xanthurénique peut former des liaisons covalentes avec des protéines. En présence de l'acide xanthurénique qui a une couleur jaune, des protéines deviennent jaunes à cause de celui-ci. Cette couleur persiste après l'électrophorèse des protéines sur le gel dénaturant. Ces résultats montrent que l'acide xanthurénique est lié avec les protéines de façon covalente. Pour changer la conformation
- 25 d'une protéine, il est suffisant de modifier un acide aminé; de nombreux exemples sont présents dans la littérature scientifique. En présence de l'acide xanthurénique comme l'indiquent les exemples donnés dans cette description, un à plusieurs acides aminés peuvent être modifiés. Pour cette raison, la présence de l'acide xanthurénique dans une cellule provoque une surexpression des protéines chaperonnes nommées "glucose regulated proteins 94" GRP94. La surexpression de
- 30 ces protéines est connue comme étant provoquée par l'accumulation des protéines mal repliées (Kozutsumi Nature 1988, 332, 462-464).

WO 00/58344

PCT/FR00/00757

L'acide xanthurénique modifie des protéines de façon aléatoire et cette modification concerne aussi les protéines chaperonnes comme par exemple la GRP 94 et la calréticuline. Etant donné que ces protéines sont responsables de la conformation correcte des protéines, leur modification accélère l'accumulation des protéines mal repliées et aussi parmi elles des immunoglobulines

- 5 mal repliées. Ces modifications complexes des protéines par l'acide xanthurénique, permettent de laisser fonctionner des cellules avec une physiologie modifiée. L'accumulation des protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans différents types de cellules (par exemple les cellules des astrocytes, les cellules épithéliales du cristallin) provoque par exemple une surexpression des proteases, une dégradation de la calréticuline, une modification du facteur nucléaire-kappaB,
- 10 et une induction du β -amyloïde (A4).

Ces résultats montrent que la formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique mène à une pathologie cellulaire en induisant le changement de nombreuses protéines. Les changements observés sont en fonction du degré de la modification de protéines par l'acide xanthurénique.

- Ces résultats montrent qu'il est possible d'induire une pathologie cellulaire de façon
- 15 artificielle en augmentant dans les cellules le niveau de protéines modifiées par l'acide xanthurénique. Ce nouveau mécanisme est provoqué par la modification des protéines par l'acide xanthurénique dans une cellule. Dans une culture cellulaire des astrocytes une augmentation du niveau de protéines modifié par l'acide xanthurénique provoque l'induction de β -amyloïde (A4), qui est reconnu par anticorps monoclonaux de Dako, Danemark,
- 20 utilisé pour le diagnostic de la maladie d' Alzheimer. La raison de cette induction de β -amyloïde est une modification de la conformation de la protéine précurseur de l'amyloïde (PPA), due à la modification par l'acide xanthurénique. Cette modification donne le signal à une induction de proteases, qui dégradent le PPA modifié et induisent la formation de β -amyloïde (A4). L'acide xanthurénique est un acide aminé de la voie de dégradation du tryptophane et son
- 25 accumulation dans différents types de cellules peut conduire à diverses pathologies. On peut prévoir que l'animal dans lequel on augmente le niveau de protéines modifiées par l'acide xanthurénique peut servir comme modèle pour étudier l'effet de médicaments.
- Une introduction directe d'acide xanthurénique par voie orale ou d'autres voies, peut servir comme un modèle de développement de la maladie d'Alzheimer, des maladies à
- 30 priones, de la cataracte sénile, de l'athérosclérose, des rhumatismes, de la dégénérescence de la rétine avec l'âge.

WO 00/58344

PCT/FR00/00757

L'observation du fait que l'acide xanthurénique provoque une dérégulation de la physiologie cellulaire permet une induction régulée de la pathologie cellulaire.

Des protéines modifiées par l'acide xanthurénique et injectées à un animal vont induire une réponse immunitaire contre les protéines mal repliées. A cause de la modification du système immunitaire par l'acide xanthurénique et à la suite d'une dégradation des protéines chaperonnes comme la GRP94, les cellules pathologiques ne sont pas éliminées. L'induction de la réponse immunitaire contre les protéines mal repliées peut prévenir l'effet pathologique qui a lieu à la formation de ces protéines au cours de vieillissement.

Les vaccins basés sur des protéines modifiées par l'acide xanthurénique vont avoir un rôle préventif contre les maladies induites par des protéines ainsi modifiées. Les protéines modifiées par l'acide xanthurénique peuvent être administrées aux mammifères en utilisant tous les solvants non toxique dans lesquels elles sont solubles. Des degrés des modifications de protéine par l'acide xanthurénique, et quantité de protéine à administrer va dépendre de protéine à modifier et de but recherché par vaccination. Les fragments de protéines, des peptides ou des séquences synthétiques peuvent être utilisés pour former des produits conjugués avec l'acide xanthurénique. Ces composés sont introduits dans un mammifère pour induire une réponse immunitaire.

Exemple 1. Formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans la culture de cellules épithéliales.

La culture primaire des cellules épithéliales de bovins dans un milieu du type milieu essentiel minimal (MEM) a été traitée par l'acide xanthurénique. L'acide xanthurénique a été ajouté dans ce milieu à concentration 0, 1, 2, 4 mM. Après 24 heures de culture les cellules ont été lavées en utilisant un tampon PBS (5 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.1) et lysées dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl (pH8), 150 mM NaCl 100µg/ml PMSF, 1% Triton X-100. Des extraits ont été appliqués sur une colonne de Sephadex G-50 et élués en utilisant 0,005 M NaHCO₃. L'acide xanthurénique a été quantifié dans les extraits de protéines par la spectrométrie UV. La concentration de protéines a été calculée en utilisant une gamme étalonnée des mesures de l'absorption des quantités connues d'albumine du bovin ayant le poids moléculaire de 67,5 kD après une incubation avec l'acide xanthurénique $\lambda=342$ nm ($E_{\lambda \text{ max}}$ 6 500 selon Merck Index, Merck and Co., édition White House Station, New York, 1996). La concentration de

WO 00/58344

PCT/FR00/00757

l'acide xanthurénique a correspondu respectivement au 0, 1, 3, 9 moles par mole de protéines. Les analyses des protéines après un transfert de gel SDS-PAGE sur une membrane de nylon (Western blot) en présence des différents anticorps ont montré qu'en présence de protéines modifiées par l'acide xanthurénique le niveau de facteur nucléaire- κ B, β -amyloïde (A4), et calpain Lp82 ont été changés.

Exemple 2

Formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans la culture cellulaire des astrocytes.

La culture d'astrocytes de rat dans le milieu MEM a été traité par l'acide xanthurénique à concentration 0, 2, 4, 8 mM. La concentration de l'acide xanthurénique (XA) dans des extraits a été calculée comme dans l'exemple 1, et a correspondu respectivement au 0 ; 1 mole XA par 8 moles de protéines ; 3 moles de XA par 2 moles de protéines ; 1 mole XA par 5 moles de protéines.

En présence de protéines modifiées par acide xanthurénique, le facteur nucléaire κ B a eu les poids moléculaires de 50 kD, 52kD, et 55 kD au lieu de la taille normale 50 kD. La formation β -amyloïde (A4), qui n'était pas détectable sans la présence de l'acide xanthurénique, a été fortement induite. Ces résultats ont montré qu'une augmentation de l'acide xanthurénique dans la cellule va provoquer une dérégulation de la physiologie cellulaire. Ces résultats montrent qu'il est possible d'induire artificiellement une pathologie cellulaire en augmentant dans une cellule le niveau des protéines modifiées par l'acide xanthurénique. Le nouveau mécanisme décrit est provoqué par la modification covalente des protéines par l'acide xanthurénique.

Exemple 3. Formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans un extrait cellulaire de la rétine.

L'acide xanthurénique à 0, 2, 4, 8 mM a été incubé avec des extraits de protéines de la rétine pendant une semaine et les extraits ont été traités comme décrit dans l'exemple 1, et les concentrations ont correspondues respectivement au 0; 2 mole XA par 1 mole de protéines; 3 moles de XA par 1 mole de protéines; 5 moles XA par moles de protéines.

Exemple 4.

Formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans la culture de tissus.

WO 00/58344

PCT/FR00/00757

- Les cristallins de porc ont été incubés dans les solutions d'acide xanthurénique 0 et 2 mM pendant une semaine. L'acide xanthurénique a été diffusé dans le cristallin. Le cortex du cristallin a été homogénéisé dans un tampon phosphate de 7.4. La partie non soluble de protéines a été séparée par centrifugation à 10 000g. La concentration des protéines a été mesurée à 280 nm,
- 5 les parties insolubles des protéines ont été dissoutes dans 4 mM urée ou dans 8 mM d'urée. L'acide xanthurénique était présent dans tous les extraits et sa quantité a augmenté avec l'insolubilité des protéines : les concentrations en acide xanthurénique dans les protéines correspondaient à 1 mole XA pour 1 mole de protéines dans la partie soluble du tampon phosphate, 2 moles de XA dans les protéines solubles dans 4mM d'urée, et 3 moles de XA
- 10 dans les protéines solubles dans 8 mM d'urée.

Exemple 5. Préparation des conjugués de l'acide xanthurénique avec des protéines de bactéries.

- Le mycelium de *Streptomyces incarnatus*, une bactérie mycelial Gram-positive, a été cultivé en l'absence ou en présence de 2 mM d'acide xanthurénique. 100 ml de chaque culture a été suspendue dans le tampon de phosphate à concentration 0.05 M, de pH 7,
- 15 contenant 0.1% de β -mercaptoéthanol. La suspension a été congelée dans un bain-marie contenant de la glace carbonique-metanol. Les cellules congelées ont été casées dans la presse de Hinton avec une pression de 360 atmosphères. Les protéines de cytosol ont été séparées de la fraction des membranes par centrifugation à 100 000g pendant une heure. La solution a été traitée par l'addition de 2,5 % de streptomycine pour précipiter les acides
- 20 nucléiques, qui ont été éliminés par centrifugation à 5000g pendant 10 min. Les concentrations d'acide xanthurénique dans les protéines ont été mesurées comme décrit dans l'exemple 1. Les concentrations en acide xanthurénique dans les protéines correspondaient à 0 et 0.5 mole d'acide xanthurénique pour une mole de protéines.

Exemple 6.

- 25 Induction d'une réponse immunitaire contre la protéine modifiée par l'acide xanthurénique.
- La calréticuline est modifiée par l'acide xanthurénique dans une cellule et partiellement dégradé. 3 mg de calréticuline dans le tampon phosphate stérile de pH 7,4 ont été incubés avec 4 mM d'acide xanthurénique pendant 72 heures, à température ambiante.
- 30 La calréticuline modifiée a été administrée aux souris. Six souris (pesant 100 g environs) ont été immunisées par injection sous-cutané en utilisant les mêmes quantités 500 μ g de

WO 00/58344

PCT/FR00/00757

calréticuline. Un autre groupe de souris est resté sans traitement. L'immunisation a été répétée trois fois dans l'intervalle de deux semaines. La calréticuline a été analysée dans le plasma des animaux après trois mois. Des protéines de plasma de souris ont été analysées par électrophorèse sur un gel dénaturant (Laemmli, Nature 1970, 227, 680-685).

- 5 Des protéines ont été transférées sur une membrane. La détection de la calréticuline a été effectuée en utilisant un anticorps contre la calréticuline. Dans le plasma de souris non traités, la calréticuline dégradée présentait un poids moléculaire de 55 kD au lieu de 63kD. Chez les souris traitées le plasma a contenu 60 pour-cent de moins de la calréticuline dégradées.
- Cette voie peut être utilisée pour retarder le vieillissement pathologique des cellules dû à une
- 10 modification de la conformation des protéines, notamment des protéines chaperonnes.
- Les injections des protéines modifiées par l'acide xanthurénique peuvent avoir un effet préventif contre les pathologies liées au vieillissement. Une immunothérapie utilisant les anticorps monoclonaux serait possible pour retarder l'effet de protéines mal repliées. Par exemple un anticorps contre la protéine précurseur d'amyloïde modifiée par l'acide
- 15 xanthurénique est supposé retarder le développement de la maladie d'Alzheimer.

WO 00/58344

PCT/FR00/00757

Revendications

1. 1) Composé destiné à provoquer des réactions immunitaires dans un organisme vivant
2. caractérisé en ce qu'il est le produit de la réaction de l'acide xanthurénique avec une protéine,
3. dans laquelle l'acide xanthurénique et ladite protéine se lient de façon covalente.
4. 2) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'acide xanthurénique est lié de
5. façon covalente à une protéine, un peptide, ou une séquence de protéine.
6. 3) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que cette protéine est une
7. protéine humaine ou une protéine d'un autre mammifère.
8. 4) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que cette protéine est une
9. protéine bactérienne.
10. 5) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la réaction de l'acide xanthurénique
11. avec une protéine, dans laquelle l'acide xanthurénique et ladite protéine se lient de façon
12. covalente, est faite par incubation de culture de cellules en présence d'acide xanthurénique.
13. 6) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la réaction de l'acide xanthurénique
14. avec une protéine, dans laquelle l'acide xanthurénique et ladite protéine se lient de
15. façon covalente, est faite par incubation de tissus en présence d'acide xanthurénique.